

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

**AVALIAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA NA FORMAÇÃO
DE BIOGEL**

MELISSA MACHADO MARTINS

Orientador: Prof. Dr. Michel Brienzo

Rio Claro - SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Câmpus de Rio Claro

MELISSA MACHADO MARTINS

**AVALIAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA
QUITOSANA NA FORMAÇÃO DE BIOGEL**

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

Rio Claro – SP

2024

M386a

Martins, Melissa Machado

Avaliação do grau de desacetilação da quitosana na formação de biogel /

Melissa Machado Martins. -- Rio Claro, 2024

53 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Ambiental) -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Geociências e Ciências
Exatas, Rio Claro

Orientador: Michel Brienzo

1. Polissacarídeos. 2. Desacetilação. 3. Quitosana. 4. Biofilme. I. Título.

MELISSA MACHADO MARTINS

AVALIAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA NA FORMAÇÃO DE BIOGEL

Trabalho de Graduação apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Comissão Examinadora

Dr. Michel Brienzo (orientador)

Dr. Eddyn Gabriel Solorzano Chavez

Dr(a). Danieli Fernanda Canaver Marin

Rio Claro, 26 de novembro de 2024.

Assinatura do(a) aluno(a)

Assinatura do(a) orientador(a)

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Sérgio e Ione, e meus irmãos Marcio e Vanessa, por todo apoio e ajuda.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Michel Brinzo, pela oportunidade de me orientar nos projetos de Iniciação Científica - agradeço pela paciência, pelo conhecimento transmitido e por me inspirar a seguir na pesquisa acadêmica.

Ao Dr. Hernán Dario Zamora Zamora pelo apoio e orientação no primeiro projeto de iniciação científica que foram base para a trajetória deste trabalho.

A todos os professores da graduação que contribuíram significativamente para minha formação acadêmica, especialmente Prof(a). Dr(a). Vânia Silvia Rosolen por tamanha dedicação ao curso de Engenharia Ambiental da UNESP de Rio Claro e por todo suporte nos projetos de extensão.

Aos colegas da turma 020 de Engenharia Ambiental da UNESP de Rio Claro, pelos projetos realizados em conjunto - a companhia de vocês tornou tudo mais alegre. Agradeço por ter aprendido com cada um.

Aos meus colegas veteranos, agradeço pelos conselhos e ajuda, especialmente à Mariana Damasceno Pazianoto pela amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade de realizar duas iniciações científicas com bolsa PIBIT.

À Comissão Permanente de Pesquisa do IGCE por ter selecionado parte deste trabalho para ser apresentado na 2ª fase do XXXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, o que resultou em um certificado de menção honrosa pelo 3º lugar dentre os trabalhos da 1ª Fase. Uma experiência feliz e gratificante.

Ao IPBEN por proporcionar toda estrutura para que este trabalho fosse realizado.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo e contribuição para a maturidade deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

“Suporta com paciência e sem murmúrio a tua parte seja qual for.”

Pitágoras

RESUMO

A desacetilação da quitosana é uma etapa fundamental para seu uso como gel ou biofilme. Atualmente toda quitosana consumida no país é importada e muitos dos produtos não informam o grau de desacetilação. O presente projeto tinha como objetivo desacetilar parcialmente a quitosana e identificar a influência da desacetilação na formação de biogel/biofilme e na emulsão com eugenol. O meio ambiente encontra-se em uma complexa situação em relação a contaminação por plásticos, devido ao seu caráter não biodegradável. Para diminuir essa contaminação e disposição irregular, o uso de filmes biodegradáveis pode ser uma solução ambientalmente correta. A quitosana é um polissacarídeo candidato para preparar emulsão com compostos bioativos, para aplicação na agricultura. Uma quitina comercial (com baixo grau de desacetilação) foi submetida a desacetilação com diferentes condições para produzir quitosana com diferentes graus de desacetilação. Essas quitosanas foram empregadas na formulação de biogel e biofilme que passou por testes de caracterização física, química e mecânica. Como resultado deste projeto foi esperado produzir um biofilme com propriedades físico-química e mecânica adequadas para a substituição do plástico derivado do petróleo e obter emulsão de eugenol com quitosana desacetilada.

Palavras-chave: Polissacarídeo, quitosana, biogel, biofilme, compostos bioativos, óleos essenciais.

ABSTRACT

Deacetylation of chitosan is a fundamental step for its use as a gel or biofilm. Currently, all chitosan consumed in the country is imported, and many products do not specify the degree of deacetylation. This project aimed to partially deacetylate chitosan and identify the influence of deacetylation on the formation of biogel/biofilm and the emulsion with eugenol. The environment is in a complex situation regarding plastic contamination due to their non-biodegradable nature. To reduce this contamination and improper disposal, the use of biodegradable films can be an environmentally correct solution. Chitosan is a polysaccharide candidate for preparing emulsions with bioactive compounds for application in agriculture. A commercial chitin (with a low degree of deacetylation) was subjected to deacetylation under different conditions to produce chitosan with varying degrees of deacetylation. These chitosans were employed in the formulation of biogel and biofilm, which underwent physical, chemical, and mechanical characterization tests. As a result of this project, it was expected to produce a biofilm with adequate physicochemical and mechanical properties to replace petroleum-derived plastics and to obtain an emulsion of eugenol with deacetylated chitosan.

Keywords: Polysaccharide, chitosan, biogel, biofilm, bioactive compounds, essential oils.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURA MOLECULAR DA QUITOSANA.....	16
FIGURA 2 - DESACETILAÇÃO DA QUITINA	18
FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DOS TESTES	22
FIGURA 4 - PONTOS DE INFLEXÃO DO TESTE POTENCIOMÉTRICO	32
FIGURA 5 - PONTOS DE INFLEXÃO DO TESTE POTENCIOMÉTRICO	33
FIGURA 6 - FILMES À BASE DA COMBINAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA	35
FIGURA 7 - FILMES À BASE DE QUITOSANA DESACETILADA COM 46%, 54% E 62% DE GD.....	36
FIGURA 8 - EMULSÃO DE EUGENOL COM QUITOSANA COMERCIAL (A) E QUITOSANA DESACETILADA (B)	43
FIGURA 9 - EMULSÃO DE EUGENOL COM QUITOSANA COMERCIAL (A) E DESACETILADA DE 62% (B) APÓS 7 DIAS EM REPOUSO	44
FIGURA 10 - EMULSÃO DE EUGENOL QUITOSANA COMERCIAL (A) E COM QUITOSANA DESACETILADA DE 62% GD (B).....	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- PROCESSO ALCALINO DE DESACETILAÇÃO DA QUITINA	28
TABELA 2 - VALORES DA TITULAÇÃO.....	29
TABELA 3 - PROCESSO ALCALINO DE DESACETILAÇÃO DA QUITINA	29
TABELA 4 - PROCESSO ALCALINO DE DESACETILAÇÃO DA QUITINA	30
TABELA 5 - VALORES DA TITULAÇÃO.....	30
TABELA 6 - TESTE POTENCIOMÉTRICO DA QUITOSANA COMERCIAL	32
TABELA 7 - PROCESSO ALCALINO DE DESACETILAÇÃO DA QUITINA	33
TABELA 8 - PROCESSO ALCALINO DE DESACETILAÇÃO DA QUITINA	34
TABELA 9 - TESTES DE ESPESSURA E OPACIDADE	37
TABELA 10 - TESTES DE SOLUBILIDADE E UMIDADE.....	38
TABELA 11 - TESTES DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO NO DMA.....	39
TABELA 12 - TESTES DE ESPESSURA DE OPACIDADE	40
TABELA 13 - TESTES DE SOLUBILIDADE E UMIDADE.....	40
TABELA 14 - TESTES DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO NO DMA.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	GERAL	14
2.2	ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	QUITINA E QUITOSANA	15
3.2	DESACETILAÇÃO DA QUITINA	17
3.3	TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA.....	19
3.4	FORMAÇÃO DE BIOFILMES	20
3.5	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES	20
3.6	EMULSÃO DE EUGENOL.....	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1	DESACETILAÇÃO DA QUITINA NO AGITADOR MAGNÉTICO	22
4.2	DESACETILAÇÃO DA QUITINA NO REATOR.....	23
4.3	GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QUITOSANA.....	23
4.4	FORMAÇÃO E SECAGEM DOS BIOFILMES	24
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES	25
4.5.1	<i>Espessura</i>	25
4.5.2	<i>Opacidade.....</i>	25
4.5.3	<i>Solubilidade em água.....</i>	25
4.5.4	<i>Umidade do biofilme</i>	26
4.5.5	<i>Resistência mecânica.....</i>	26
4.6	PREPARO DAS EMULSÕES	26
4.6.1	<i>Capacidade de retenção de óleo.....</i>	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	DESACETILAÇÃO DA QUITINA NO AGITADOR MAGNÉTICO E GRAU DE DESACETILAÇÃO.....	28
5.2	DESACETILAÇÃO DA QUITINA NO REATOR E GRAU DE DESACETILAÇÃO	32
5.3	FORMAÇÃO E SECAGEM DOS BIOFILMES	34
5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES	36
5.5	EMULSÃO DE EUGENOL COM QUITOSANA DESACETILADA	41
6	CONCLUSÃO	46

1 INTRODUÇÃO

Os compostos derivados do petróleo podem ser substituídos por fontes renováveis como lipídeos, polissacarídeos e proteínas, originando os filmes biodegradáveis (FAKHOURI et al., 2007; MALI et al., 2010). Tanto a xilana quanto o amido representam um terço da biomassa renovável disponível, estão presentes na maior parte das plantas, apresentam boa barreira para gases e já são utilizadas na indústria farmacêutica e alimentícia (LUCENA, 2011; SCHMIDT et al., 2012). Entretanto, o desafio encontrado em utilizar estes açúcares como base para filmes é a sua natureza hidrofílica, e suas propriedades mecânicas baixas (SCHMIDT et al., 2012).

Os plastificantes são frequentemente utilizados na fabricação de biofilmes com a finalidade de melhorar sua processabilidade, alterando propriedades necessárias para determinadas aplicações como as propriedades reológicas e mecânicas (BERTUZZI et al., 2012; IMRE & PUKÁSZNKY, 2013). Há vários estudos que apontam o uso de moléculas ou compostos polares de baixa massa molecular na plastificação de biofilmes contendo amido, como água, glicerol, alguns monossacarídeos, ureia e formamida (BERTUZZI et al., 2012; IMRE & PUKÁSZNKY, 2013).

Devido a composição química dos carboidratos apresentar uma grande quantidade de grupos hidroxila, há ilimitadas possibilidades de ligantes. Como o uso de pequenas moléculas ligantes, que estabelecem ligações químicas entre as diferentes fases de uma solução filmogênica heterogênea (IMRE et al., 2019). Há vários estudos que relatam promissores resultados para o uso de poli (ácido carboxílico), como por exemplo, ácido cítrico, málico e tartárico. Estes ácidos são alternativas ambientalmente benignas, não tóxicas e não voláteis, além de serem abundantes e relativamente mais acessíveis por serem obtidos a partir de rotas biológicas não onerosas (IMRE et al., 2019).

Entre os polímeros de origem biológica destaca-se a quitosana, a qual é produzida pela desacetilação alcalina parcial ou total da quitina; sendo um polissacarídeo que possui na sua cadeia um grupo amino no carbono 2, e é constituído por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina. Pouco solúvel em água, a solubilização é feita através de um polycation obtido a partir de ácidos (minerais ou orgânicos) em função da protonação dos grupos aminos livres da cadeia polimérica. Assim, a amina primária da quitosana é responsável pela obtenção dos compostos derivados, que por sua vez estão diretamente ligados ao grau de desacetilação (parâmetro mais importante o aspecto químico) (LLANOS et al., 2021).

Contudo, a única empresa brasileira que produzia quitosana fechou, e este produto agora é importado. O problema é que toda quitosana que chega ao mercado brasileiro não apresenta em sua ficha informações importantes como o grau de desacetilação. Esta informação é fundamental para pesquisas científicas na produção de bioplásticos e biogel. Neste contexto, o objetivo deste estudo é avaliar a influência do grau de desacetilação da quitosana na produção de biogel. Este biogel tem finalidade de proteger compostos ativos, no caso deste estudo o eugenol, o qual tem demonstrado eficácia contra o cancro cítrico.

A quitosana e a quitina são aminopolissacarídeos (ASSIS; SILVA, 2003) de estrutura semelhante à da celulose. Como diferença a quitina apresenta em sua estrutura um grupo acetamido (DALLAN, 2005), a partir do qual, por meio da desacetilação parcial, se obtém a quitosana (DON *et al.*, 2006). Nessa conversão, estão presentes vários grupos amino livres na estrutura, o que confere à quitosana expressiva característica catiônica (WANG *et al.*, 2004).

O grau de desacetilação (GD) da quitosana é um parâmetro fundamental para esse polímero, pois surge da sua obtenção a partir da quitina (SILVA; MANO; REIS, 2008). O GD relaciona a quantidade de grupos amino que estão livres na cadeia polimérica (SANTOS, 2004), por isso exerce influência nas suas propriedades físicas, químicas e biológicas (TAN *et al.*, 1998), já que interfere em aspectos como solubilidade (WU; ZIVANOVIC, 2008); comportamento mecânico (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001); biodegradação (KASAAI, 2009); dentre outros.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste projeto foi avaliar a produção de biofilme utilizando quitosana com diferentes graus de desacetilação e a influência do grau de desacetilação na emulsão de eugenol. A influência da desacetilação foi avaliada nas propriedades físico-químicas e mecânicas do bioplástico.

2.2 Específicos

- a. Desacetilar a quitina comercial utilizando agitador magnético, obtendo quitosana com diferentes graus de desacetilação.
- b. Desacetilar a quitina comercial utilizando reator de metal, obtendo quitosana com diferentes graus de desacetilação.
- c. Determinar o efeito da desacetilação nas propriedades físico-químicas e mecânicas do bioplástico na quitosana desacetilada no agitador magnético
- d. Determinar o efeito da desacetilação nas propriedades físico-químicas e mecânicas do bioplástico na quitosana desacetilada no reator de metal.
- e. Determinar o efeito da desacetilação da quitina na emulsão de eugenol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quitina e quitosana

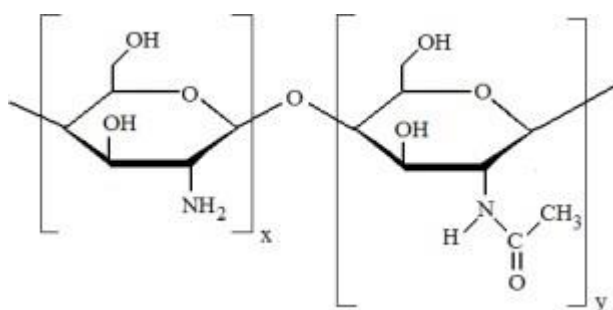
A quitina é o segundo composto orgânico mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose (ASSIS; SILVA, 2003). Ela desempenha um papel estrutural equivalente à celulose nas plantas e ao colágeno nos animais superiores (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). A quitina é encontrada nas carapaças de crustáceos, como camarões, caranguejos, lagostas, siris e krills (NGAH; KAMARI; KOAY, 2004), além de compor o exoesqueleto de artrópodes, incluindo insetos como formigas e besouros (BRITO et al., 2009). Também está presente na parede celular de fungos, fermentos (WAN et al., 2003) e nematoides. Alguns tipos de fungos possuem quitosana naturalmente em suas paredes celulares (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006), como é o caso de certas espécies de cogumelos (VINSOVA; VAVRIKOVA, 2008).

Além disso, a quitina é um polímero de cor branca, rígido e inelástico (KUMAR, 2000), caracterizado por sua inércia química e insolubilidade em água, solventes orgânicos, ácidos diluídos e soluções alcalinas (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). Embora seja solúvel em ácidos minerais concentrados, essa solubilidade é acompanhada pela gestão da cadeia polimérica (SANTOS, 2004). A quitina também pode ser dissolvida em ácidos específicos, como hexafluoroisopropanol, hexafluoroacetona e cloroálcoois, quando combinadas com soluções aquosas de ácidos minerais (KUMAR, 2000). Sua difícil solubilização está relacionada à extensa formação de ligações de proteção em sua estrutura semicristalina (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

Quanto a quitosana, é um polissacarídeo insolúvel em água, ácidos graxos concentrados, bases, álcoois e acetona (DALLAN, 2005), assim como em soluções com pH superior a 7, devido às fortes ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que estabilizam sua estrutura (MA et al., 2009). No entanto, a quitosana é reativa e solúvel em determinadas condições (ASSIS; SILVA, 2003), como em ácidos fracos e diluídos com pH inferior a 5. Nessas condições, os grupos de aminoácidos da quitosana são protonados, tornando suas moléculas completamente solúveis (TUZLAKOGLU et al., 2004). Entre os ácidos que solubilizam a quitosana estão os inorgânicos, como ácido nítrico, perclórico, fosfórico (DALLAN, 2005) e clorídrico (SILVA et al., 2004), e os orgânicos, como ácido acético - o solvente mais amplamente utilizado (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009) -, ácido fórmico, láctico e cítrico (SILVA et al., 2004).

A quitosana é obtida a partir da desacetilação parcial da quitina em solução alcalina, processo que ocorre em diferentes graus de ocorrência (DON et al., 2006). Esse processo de N-desacetilação resulta na formação de um copolímero composto por 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose. Dessa forma, a quitosana é caracterizada como um copolímero constituído por unidades monoméricas de glicosamina (GliN) e acetilglicosamina (GliNac), representadas, na Figura 1, pelas unidades x e y, respectivamente (SILVA et al., 2004).

Figura 1- Estrutura molecular da quitosana.



Fonte: SILVA, 2004.

Neste caso, a proporção dos grupos GliN presentes na estrutura da quitosana é denominada grau de desacetilação (GD), correspondendo aos grupos aminoácidos livres no polímero (SANTOS, 2004). Esse parâmetro é utilizado para distinguir entre quitina e quitosana (SILVA; MANO; REIS, 2008). Assim, o material é classificado como quitosana quando o GD é superior a 50% ($x > 50\%$), conforme ilustrado na Figura 1 anterior. Caso contrário, é considerado quitina ($y > 50\%$). Preparações comerciais de quitosana geralmente apresentam GD variando entre 50% e 90% (SUH; MATTHEW, 2000).

Portanto, a quitina e a quitosana são exemplos de polissacarídeos altamente básicos. A solubilidade da quitosana deve-se ao seu comportamento como uma base forte, atribuída aos seus grupos amino primários, que possuem um pKa de 6,3. Dessa forma, a quitosana é solúvel em soluções com pH abaixo de 6, mas torna-se insolúvel em pH acima desse valor. A transição entre as formas solúveis e insolúveis ocorre na faixa de pH de 6 a 6,5 (PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009).

A produção de quitina e quitosana é frequentemente realizada a partir de resíduos da indústria de alimentos enlatados à base de crustáceos, como caranguejo e camarão. Esse processo

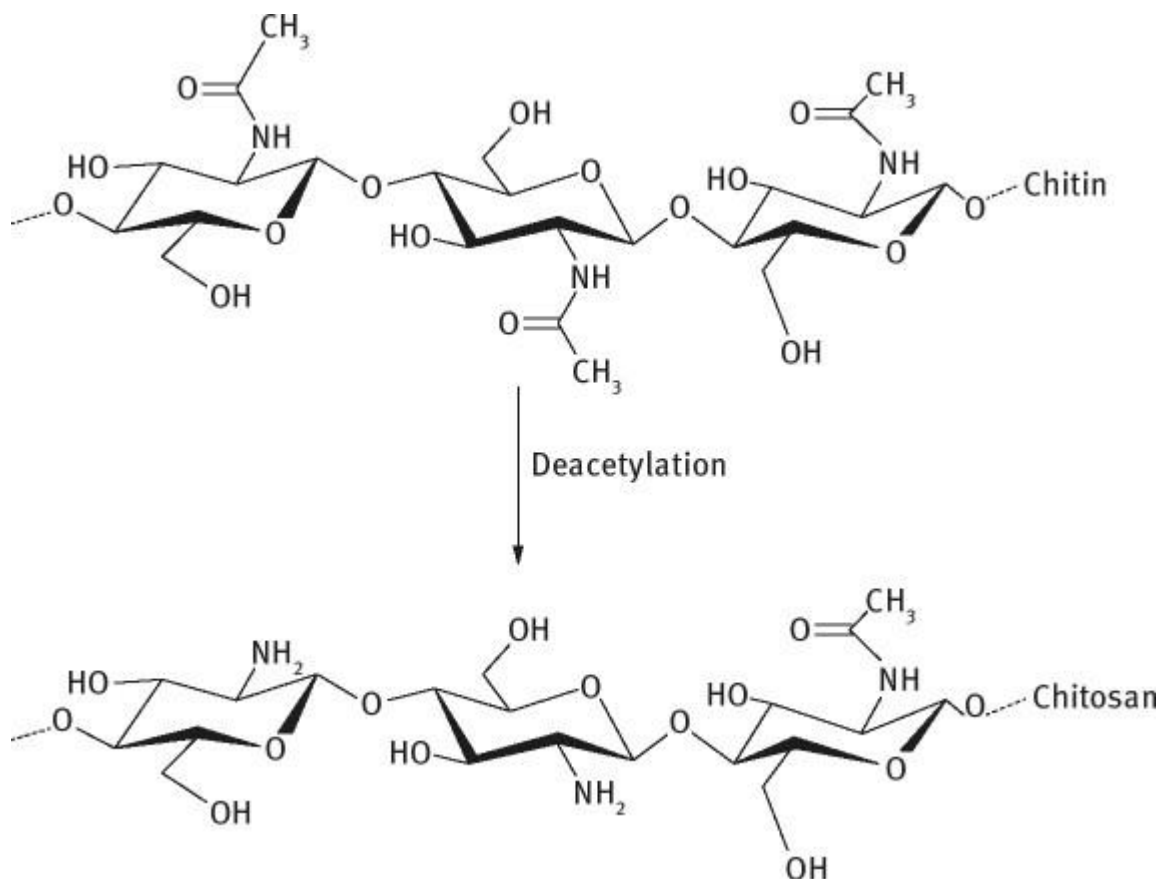
é considerado de custo relativamente baixo (KUMAR, 2000). As carapaças de crustáceos, abundantes e geralmente descartadas pela indústria pesqueira, são frequentemente vistas como resíduos poluentes. O aproveitamento desses resíduos contribui para a redução do impacto ambiental causado pelo seu acúmulo nos locais de geração ou armazenamento (AZEVEDO et al., 2007). Dessa forma, a produção de quitosana se torna economicamente viável e ecologicamente benéfica, ao utilizar subprodutos da indústria pesqueira (CAMPOS et al., 2005).

3.2 Desacetilação da quitina

Uma das propriedades mais significativas da quitosana é o seu grau de desacetilação (GD), que diferencia a quitosana da quitina, o polímero de origem. O GD está intimamente relacionado tanto às aplicações práticas da quitosana quanto às suas propriedades químicas, físicas (TAN et al., 1998), biológicas e mecânicas (KASAAI, 2009).

Ele indica a quantidade de grupos amino (NH_2) que podem ser protonados em meio ácido, estando diretamente relacionado à sua solubilidade (SILVA et al., 2004). Além de ser uma classificação de nomenclatura para distinguir quitina de quitosana, essas espécies podem ser diferenciadas com base em suas propriedades de solubilidade em ácido acético 0,1M: a quitina é considerada uma forma insolúvel, enquanto a quitosana é uma forma solúvel (KUMIRSKA et al., 2010).

Figura 2 - Desacetilação da quitina.



Fonte: BEREZINA, 2016.

A desacetilação da quitina ocorre por meio da utilização de uma substância alcalina em temperaturas elevadas e por um período prolongado, resultando na formação de quitosana (VELDE; KIEKENS, 2004). Durante esse processo, o composto alcalino remove proteínas simultaneamente à desacetilação (KUMAR, 2000). Normalmente, empregam-se soluções altamente especializadas em hidróxido de sódio, variando entre 40% e 50% (CANELLA; GARCIA, 2001). Em condições econômicas, um grau de desacetilação (GD) inferior a 40% na quitina já é suficiente para obter quitosana, enquanto em condições heterogêneas, o GD necessário é ainda menor (VELDE; KIEKENS, 2004).

Essa desacetilação da quitina para a obtenção da quitosana deve ser conduzida de maneira criteriosa para garantir um alto grau de pureza e a ausência de contaminantes, como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006). A certificação da quitosana

obtida, em termos de pureza e coloração, depende da remoção eficaz desses resíduos, uma vez que a presença de proteínas e pigmentos pode comprometer sua aplicação, especialmente em usos como biomateriais (RINAUDO,2006).

A obtenção de quitosana com elevado grau de desacetilação (GD) é um desafio, pois, à medida que o GD aumenta (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006), ou seja, com o prolongamento da ocorrência e a produção de polímeros mais desacetilados, também aumenta o risco de manipulação de diversas cadeias poliméricas (AZEVEDO et al., 2007). Na prática, o GD máximo pode ser alcançado em um único tratamento alcalino geralmente varia entre 75% e 85% (ARANAZ et al., 2009).

A determinação do GD faz parte das análises de rotina realizadas para o controle de qualidade de amostras de quitina e quitosana. Ajustes no processamento desses polímeros baseados no GD são geralmente necessários para facilitar uma preparação mais rápida e viável das amostras (ZHANG *et al.*, 2005). Portanto, é essencial um método padrão para se determinar o GD da quitosana, que satisfaça aos fabricantes e aos usuários finais, a fim de promover um maior aproveitamento desse material (TAN *et al.*, 1998).

3.3 Titulação Potenciométrica

Em uma titulação, pequenos volumes da solução reagente, conhecidos como titulantes, são acrescentados à solução contendo o titulado até que o fato se complete. A partir da quantidade de titulante utilizado, é possível calcular a quantidade do titulado presente. As titulações mais comuns envolvem reações ácido-base. Para que uma ocorrência de titulação seja eficiente, dois fatores principais devem ser atendidos: uma constante de equilíbrio deve ser elevada, e o tempo de ocorrência deve ser curto. Isso garante que cada porção de titulante adicionado seja consumida de forma rápida e completa pelo analito até que este se esgote (HARRIS, 2008).

A titulação potenciométrica é um tipo de titulação em que o ponto final é determinado com base nos valores de potencial ou pH da solução, medidos para diferentes volumes de reagente adicionados. Para garantir a precisão do ensaio, é necessário manter uma solução bem agitada, garantindo sua homogeneidade. Como a identificação do ponto final não depende de observações visuais, como a mudança de cor de um indicador, as titulações potenciométricas são consideradas um dos métodos analíticos mais precisos (GONÇALVES, 2001).

O grau de desacetilação se baseia na quantidade de mols de NaOH que conseguem neutralizar a mesma quantidade em mols de íons NH_3^+ presentes na quitosana, os quais correspondem ao número de mols de grupos amino livres na estrutura. Esses grupos estão associados às unidades de glicosamina presentes na amostra de quitosana, e que determinam o seu GD (SWEIDAN *et al.*, 2011).

Essa titulação potenciométrica é essencialmente uma titulação em que o ponto final se determina a partir dos valores de potencial ou pH da solução para os vários volumes de reagente adicionados. Para isso, durante o ensaio a solução deve ser bem agitada para que fique homogênea. Como a localização do ponto final não envolve os erros pessoais que entram na mudança de cor de um indicador, as titulações potenciométricas constituem um dos métodos analíticos mais exatos (GONÇALVES, 2001). As vantagens relacionadas a essa técnica abrangem o fornecimento de dados mais confiáveis do que os gerados por titulações que empregam indicadores químicos; a utilidade em especial em casos de soluções coloridas ou turvas; a detecção da presença de espécies insuspeitas (SKOOG *et al.*, 2006); a possibilidade de se realizar titulações em meio não aquoso (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000).

3.4 Formação de biofilmes

Os filmes elaborados a partir de polissacarídeos ou proteínas possuem excelentes propriedades mecânicas, ópticas e sensoriais, porém são sensíveis à umidade e apresentam alto coeficiente de permeabilidade ao vapor d'água. A combinação dos biopolímeros tem como vantagem agregar os pontos positivos de cada um dos constituintes utilizados (GALLO, 2000).

A quitosana é um biopolímero derivado da quitina com propriedades antimicrobianas, biodegradáveis e biocompatíveis. Sua estrutura catiônica permite interações com membranas celulares microbianas, conferindo-lhe eficácia contra uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas (KRITCHENKOV *et al.*, 2023).

3.5 Caracterização dos biofilmes

A análise da perda de massa após a imersão em líquidos fornece dados sobre a integridade estrutural dos filmes. Essa abordagem é frequentemente utilizada em estudos comparativos entre filmes reticulados e não reticulados (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2011). A composição dos filmes influencia diretamente suas propriedades. Por exemplo, a adição de plastificantes, como o

glicerol, pode aumentar a capacidade de absorção de umidade, enquanto a reticulação com agentes como ácido cítrico reduz a solubilidade, conferindo maior resistência ao filme (RAY et al., 2015).

A opacidade está diretamente relacionada à espessura do filme. Filmes mais espessos apresentam maior opacidade devido à menor transmissão da luz. Filmes mais espessos apresentam maior opacidade, mas a homogeneidade da espessura é crítica para garantir resultados consistentes nos testes (FERREIRA et al., 2018). A espectrofotometria é amplamente utilizada para medir a absorvância de filmes em diferentes comprimentos de onda (200–800 nm). Filmes à base de quitosana frequentemente apresentam alta absorção na região UV (200–300 nm) devido à presença de grupos amina e carbonila em sua estrutura (MOURA et al., 2020).

A espessura e a composição influenciam diretamente a resistência mecânica. A incorporação de fibras naturais ou nanopartículas pode aumentar a rigidez e a resistência do filme (RAY et al., 2015). Filmes higroscópicos, como os de quitosana, apresentam variações na resistência mecânica dependendo do teor de umidade do ambiente. Ambientes mais úmidos podem reduzir significativamente a resistência mecânica (MOURA et al., 2020).

3.6 Emulsão de eugenol

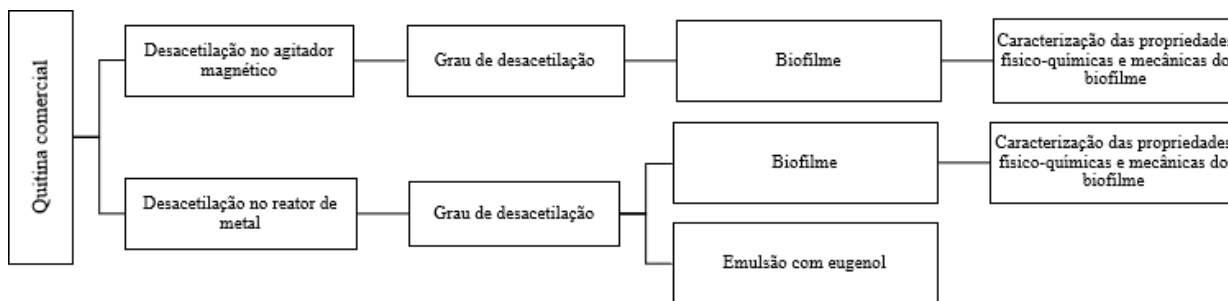
As emulsões são sistemas coloidais que consistem em uma fase dispersa e uma fase contínua, estabilizadas por agentes emulsificantes. Essas formulações são amplamente utilizadas na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia para encapsular e proteger compostos bioativos hidrofóbicos, como o eugenol (SOUSA et al., 2019). O eugenol, um fenilpropeno derivado do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), possui propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, o que o torna promissor para aplicações tecnológicas (RAUT e KARUPPAYIL, 2014).

As emulsões têm sido extremamente empregadas para encapsular compostos bioativos lipofílicos, como o eugenol, devido à sua capacidade de proteger o ativo de fatores externos, melhorar sua biodisponibilidade e permitir uma liberação controlada. A quitosana, um biopolímero derivado da quitina, é utilizada como estabilizante em emulsões devido às suas propriedades antimicrobianas, biodegradáveis e biocompatíveis, tornando-a uma opção promissória para formulações sustentáveis e multifuncionais (SHAH et al., 2020; LI et al., 2020).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas dos testes que foram realizados estão ilustradas na Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma das etapas dos testes.



Fonte: Autor

4.1 Desacetilação da quitina no agitador magnético

A quitina foi desacetilada alterando as condições de porcentagem de NaOH (LAVORGNA et al., 2010). Foram feitos quatro testes com o objetivo de obter a desacetilação parcial da quitina comercial.

No primeiro teste, foi adicionado 1 g de quitina em soluções de NaOH nas concentrações de 10%, 20%, 30%, 40% e 50% (m/v). Essas soluções foram misturadas e autoclavadas a 120 °C durante 1 hora. Esse processo tinha o objetivo de verificar qual concentração apresentaria o maior rendimento e grau de desacetilação (GD). Em temperatura ambiente, as amostras passaram pelo processo de filtragem utilizando papel filtro e água destilada. O pH da água foi verificado durante o processo e ao ser neutralizado, as amostras foram secas em estufa a 30 °C, e posteriormente foram pesadas para obtenção da massa final recuperada.

No segundo teste, repetiu-se as concentrações do primeiro teste, com a diferença na temperatura e no tempo das amostras na autoclave, que passou de 120 °C para 100 °C, e de 1 hora para 2 horas. No terceiro teste, manteve-se as concentrações de 1 g e 1,5 g de quitosana. Houve mudança no tempo, que passou de 2 horas para 3 horas, e na temperatura, que passou de 100 °C para 127 °C.

Repetiu-se os testes com outra metodologia (SOUZA, 2017). Uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) foi adicionada à quitina com grau de desacetilação (GD) de 15%. Diluiu-se 50 g de

NaOH em água destilada até completar 100 mL de volume, para obter a proporção de 100% m/v em um frasco Schott, e adicionou-se 2 g de quitina. A amostra foi submetida à agitação em um agitador magnético a 350 rpm, sob temperatura de 110 °C durante 3 horas com o frasco Schott tampado. Após o término da reação e resfriamento do frasco em temperatura ambiente, a amostra foi vertida em um papel filtro e submetida à etapa de lavagem com água destilada para remoção do NaOH. Após 14 litros de água destilada e da neutralização do pH, a amostra foi levada a estufa sob temperatura de 105 °C de um dia para outro, com aproximadamente 12 horas de secagem.

4.2 Desacetilação da quitina no reator

Empregou-se o uso do reator de metal para os testes de desacetilação. A quitosana foi desacetilada alterando as condições de porcentagem de NaOH, conforme método descrito na literatura (LAVORGNA et al., 2010). Cerca de 4 g de quitina foram dissolvidos em 400 mL de solução de NaOH, contendo uma concentração de NaOH de 50% (m/v). Foi utilizado reator de metal, pequeno, com capacidade total de 600 mL, com agitação magnética, temperatura e pressão.

4.3 Grau de desacetilação da quitosana

Para a determinação do teste potenciométrico, foram realizados quatro testes de titulação, para isso foi misturado 0,15 g de quitosana com 20 mL de HCL 0,3M e levado no agitador magnético por 30 minutos. Em seguida a solução foi titulada com NaOH 0,1M registrando os valores do pH da solução a cada 0,5 mL (WESKA et al., 2007). Com estes dados, obteve-se uma curva potenciométrica que mostra dois pontos de inflexão, a diferença dos volumes corresponde ao consumo de ácido para a salificação dos grupos amina e permite a determinação do grau de desacetilação da amostra de quitosana através da equação 1 - no Excel foi possível perceber uma curva com dois pontos de inflexão que forneceram o grau de desacetilação.

$$\% NH_2 = \frac{16.1 \cdot (V_2 - V_1) \cdot M_{NaOH}}{m} \quad (1)$$

Em que:

- %NH₂: Grau de desacetilação, %;
- V₂: Volume referido ao segundo ponto de inflexão, mL;
- V₁: Volume referido ao primeiro ponto de inflexão, mL;

- MNaOH: Molaridade da solução alcalina, M;
- m: massa da amostra de quitosana.

O teste potenciométrico foi adaptado para a fim de tornar o cálculo do grau de desacetilação mais preciso. Nesta etapa, foram dissolvidos 40 mg de quitosana em 10 mL de HCL 0,1 mol/L. A solução foi agitada por 30 minutos no agitador magnético e em seguida foi titulada uma solução de NaOH 0,1 mol/L. Registrou-se o pH da solução a cada 0,5 mL. Segundo a metodologia (DE SOUZA, 2013), o gráfico no Excel gerou dois pontos de inflexão correspondente à neutralização do ácido e à desprotonação dos grupos aminos.

Uma terceira metodologia foi utilizada para o teste potenciométrico, utilizou-se a metodologia de Tan et al. (1998) a fim de padronizar a determinação do grau de desacetilação (GD) das amostras.

Dissolveu-se 0,05 g de quitosana ($GD \cong 75\%$) em 20 mL de HCl 0,1 mol/L mais 10 mL de água destilada. A solução de quitosana foi homogeneizada no agitador magnético por 40 minutos e, em seguida, titulada com NaOH 0,1 mol/L. A partir do registro dos valores de pH, conferidos a cada 0,25 mL de NaOH adicionados, gerou-se uma curva de titulação potenciométrica, com dois pontos de inflexão. O volume de NaOH em cada ponto foi aplicado à equação 1 (TAN et al. 1998):

$$DD = 100 - [A / (W - 204A) / 161 + A] \times 100 \quad (1)$$

Em que:

- A: quantidade de grupos aminos livres na quitosana;
- W: massa da amostra de quitosana utilizada;
- 204 e 161: constantes de quitosana e quitina.

4.4 Formação e secagem dos biofilmes

Para a formação do biogel, foi estabelecida uma proporção de 1 g de quitosana para 100 mL de ácido acético 2%. Em seguida, foi preparado uma solução de 2 g de quitosana com 200 mL de solução de ácido acético e agitado a 550 rpm durante 4 horas a 25 °C (CHEN e tal., 2009; LAVORGNA et al., 2010). Nos últimos 30 minutos de agitação foram adicionados 0,4 g de glicerina, o que equivale a 0,3174 mL/L correspondente a 20% de glicerina em relação ao peso da quitosana. A mistura ficou em repouso durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente,

foram adicionados 101,52 g do material em placa Petri quadrada 12 cm² e levado à incubadora DBO a 35 °C durante 3 dias (FAKHOURI, et al., 2007; SILVA, 2011).

Em seguida, a quitosana desacetilada foi combinada parcialmente com a quitina comercial para formar um material que fosse a combinação de quitina e quitosana ($m_1 + m_2 = 1$ g de quitosana). Foram criadas cinco composições de biogel, utilizando 15% e 75% como os pontos de referência de pureza, e a partir desses valores foram elaboradas as misturas necessárias para produzir biogéis com 30%, 45% e 60% de pureza. Para o biogel de 30%, utilizou-se 0,25 g de quitosana (m_1) com 75% de quitina (m_2). Para o biogel de 45%, utilizou-se 0,5 g de quitosana (m_1) com 0,5 g de quitina (m_2). Para o biogel de 60%, utilizou-se de 0,25 g de quitina (m_1) com 75% de quitosana (m_2).

4.5 Caracterização dos biofilmes

Nos testes dos filmes de quitosana desacetilada tanto no agitador magnético quanto no reator, foram selecionados os materiais com maiores graus de desacetilação por facilitarem a remoção das placas Petri.

4.5.1 Espessura

Para a determinação da espessura, foi necessário um micrômetro e o valor final foi a média aritmética de seis medidas aleatórias em diferentes partes do biofilme (FAKHOURI, et al., 2007).

4.5.2 Opacidade

A opacidade dos filmes foi determinada em espectrofotômetro. Os filmes foram cortados em retângulos e aderidos à parede interna da cubeta de quartzo. A leitura será realizada em triplicata, com um comprimento de onda de 450 nm (MATTEI, et al., 2013). Com os valores de absorvância, foi possível calcular a opacidade como uma relação entre a absorvância e a espessura do filme.

4.5.3 Solubilidade em água

Foram cortadas amostras de 2 cm de diâmetro e colocadas em estufa a 65°C durante 36 horas, e em seguida, foram pesadas, obtendo-se a massa inicial da amostra. As amostras secas

foram inseridas em um béquer com 50 mL de água destilada, e agitadas lentamente, a 25 °C por 24 horas. Após esse período, a amostra foi colocada em estufa, durante 24 horas a 65 °C, para sua secagem e posteriormente pesada para obtenção da massa final (FAKHOURI et al., 2007; SILVA, 2011).

4.5.4 Umidade do biofilme

Foram cortadas amostras de 4 cm², pesadas e inseridas em estufa a 65 °C durante 36 horas (SILVA, 2011). Após secas, as amostras foram pesadas novamente, sendo determinado seu potencial de umidade.

4.5.5 Resistência mecânica

A tensão de tração da carga máxima e o alongamento na ruptura – stress – do bioplástico foram medidos no DMA (Discovery DMA – 850) com corpos de prova com 4 cm de comprimento e 1 cm de largura; A espessura foi previamente medida em regiões diferentes e aleatórias por um micrômetro digital (0-25 mm com resolução de 0,001 mm, Mitutoyo 293-230).

4.6 Preparo das emulsões

Para uma solução de emulsão de 50 mL, utilizou-se 1% de quitosana solubilizada em ácido acético 2%. Primeiro, utilizou-se quitosana de 75% de grau de desacetilação (0,05 g), solubilizada em ácido acético 2% (1,5 mL), com 35% de eugenol (0,175 mL) e 10% de emulsificante Tween 80 (0,0175 mL). A mistura foi homogeneizada em sistema de rotor ultra-turraz em velocidade de 1050 rpm por 30 minutos. O feito o mesmo procedimento para a emulsão com quitosana desacetilada de 62%. O método seguiu como base o processo de emulsão reportado para quitosana e óleos (BRITO et al., 2022). A solução foi analisada no microscópio a 2000x de ampliação para verificar o encapsulamento da quitosana pelo eugenol (BRITO et al., 2022).

4.6.1 Capacidade de retenção de óleo

O método de centrifugação descrito por Meng et al. (2018) foi empregado para determinar os valores de Perda de óleo (PO) e Capacidade de Retenção de Óleo (CRO) das amostras. Aproximadamente 1-1,5 g de cada amostra foi pesada em um tubo Eppendorf e submetida à

centrifugação a 6000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação, o excesso de óleo foi decantado, e a massa do tubo contendo a amostra residual foi medida. O tubo vazio foi previamente pesado para determinar a massa exata da amostra. Os valores de (PO) foram calculados usando a Equação (1), enquanto a (CRO) foi determinada pela Equação (2):

$$PO = [(m1 - m) - (m2 - m) / (m1 - m)] \times 100\% \quad (1)$$

$$CRO (\%) = 100 - PO (\%) \quad (2)$$

Em que:

- (m) representa a massa do tubo Eppendorf;
- (mL) é a massa inicial da amostra;
- (m2) é a massa da amostra após a centrifugação.

No experimento, foi utilizada uma formulação de biogel composta por 1% de quitosana, 35% de eugenol e 10% de Tween, com base no eugenol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desacetilação da quitina no agitador magnético e grau de desacetilação

Nos testes iniciais realizados na autoclave, como mostra a Tabela 1, observou-se que no processo de filtragem foi necessário grande volume de água em relação a baixa quantidade de amostra recuperada, demonstrando uma perda considerável de material durante o processo de desacetilação. Conforme aumenta a concentração de NaOH, maior o volume de água necessário para lavar o material.

Tabela 1- Processo alcalino de desacetilação da quitina.

NaOH (%)	ID amostra	Massa quitina (g)	Massa quitosana obtida (g)	Rendimento (%)	Volume H ₂ O gasto (L)
10	1	1	0,7	70,2	2,5
	2		0,71	71	
20	1	1	0,17	12,2	4,5
	2		0,18	19	
30	1	1	0,16	16,8	6,5
	2		0,15	15,6	
40	1	1	0,22	22,6	9
	2		0,21	21,2	
50	1	1	0,23	23,8	10
	2		0,24	24,4	

Fonte: Autor.

Na Tabela 2, no teste 1 e 2, a proporção de purificação das amostras se mostraram menor do que o esperado, 37% e 26,9%. Esse valor foi obtido na concentração de 50% de NaOH, o que sugere que a quantidade de hidróxido de sódio influencia na eficiência da reação, confirmando com a literatura que diz que a proporção ideal de NaOH varia entre 40% e 50% (m/v) (CANELLA; GARCIA, 2001).

Tabela 2 - Valores da titulação.

Grau de desacetilação obtido para cada amostra (%)						
ID teste	NaoH 0%	NaoH 10%	NaoH 20%	NaoH 30%	NaoH 40%	NaoH 50%
1	10,4	16,1	29,5	21,5	31,9	37
2	10,5	15,8	18,8	17,3	16,1	26,9

Fonte: Autor

No ensaio da Tabela 3, repetiu-se as concentrações do teste anterior, com adaptações na temperatura e no tempo de reação das amostras na autoclave, que passaram de 120 °C para 100 °C e de 1 hora de reação para 2 horas.

Tabela 3 - Processo alcalino de desacetilação da quitina.

NaoH (%)	ID amostra	Massa quitina (g)	Massa quitosana obtida (g)	Rendimento (%)	Volume H2O gasto (L)
10	1	1	0,69	69,1	3
	2		0,71	71	
20	1	1	0,53	53,5	5
	2		0,55	55,2	
30	1	1	0,46	46,8	6
	2		0,46	40,4	
40	1	1	0,4	40	8
	2		0,4	46,6	
50	1	1	0,31	31,1	8
	2		0,34	24,4	

Fonte: Autor

Realizou-se mais um ensaio, Tabela 4, e manteve-se somente a concentração de 50% de NaOH, por ter proporcionado maior grau de desacetilação, ainda que abaixo do esperado e ser um dos valores ideais para o processo de desacetilação (CANELLA; GARCIA, 2001). Para isso, usou-se três quantidades diferentes de quitina: 0,5 g, 1 g e 1,5 g, e mudou-se a temperatura da autoclave que passou de 100 °C para 120 °C, e em seguida passou de 120 °C para 127 °C.

Tabela 4 - Processo alcalino de desacetilação da quitina.

NaoH (%)	ID amostra	Massa quitina (g)	Massa quitosana obtida	Rendimento (%)	Volume H₂O gasto (L)	Temperatura (°C)
50	1	0,5	0,1	21,1	6	120
	2	1	0,13	13,3		
	3	1,5	1,25	16,7		
50	1	1	0,13	13,7	6	127
	2	1	0,11	11,3		
	1	1,5	0,18	12,3		
	2	1,5	0,19	13,3		

Fonte: Autor

No ensaio seguinte, Tabela 5, na reação a 127 °C, manteve-se as concentrações de 1 g e 1,5 g de quitina. Houve mudança no tempo de reação que passou de 2 horas para 3 horas. Além disso, observou-se que o grau de desacetilação (GD) se manteve baixo nos testes 3 e 4. Apesar das amostras com 1 g e 1,5 g de quitina oferecerem maiores graus de desacetilação, neste caso continuou sendo baixo, uma vez que o grau de desacetilação (GD) embora tenha apresentado valores acima do mínimo (45% GD), principalmente na amostra 3 com 54,4% GD, o foco era obter o máximo de desacetilação possível comparando-se com a quitosana comercial (GD \cong 75%). Além disso, considerando que durante o processo de desacetilação há perda significativa de material, foi necessário adaptar a quantidade para o mínimo de 1 g de quitina.

Tabela 5 - Valores da titulação.

ID amostra	Quitina (g)	Grau obtido (%)
3	0,5	44
	1	54,4
	1,5	47,2
4	1	39,5
	1,5	48,3

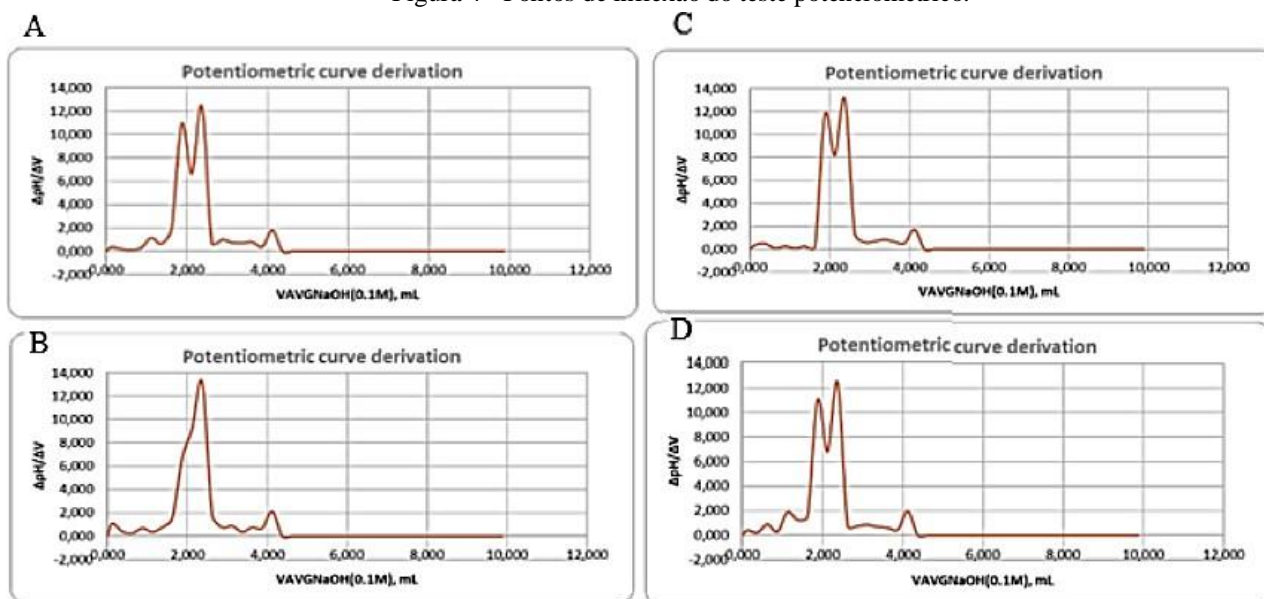
Fonte: Autor

Nos ensaios seguintes, acrescentou-se a etapa de secagem na estufa entre 12 e 15 horas a 45 °C logo após o processo de filtragem. Contudo, o grau de desacetilação (GD) atingiu apenas 40,8%. Além disso, mudou-se a quantidade de quitosana que passou para 50 mg (0,05 g) com o intuito de obter os dois pontos de inflexão no Excel no teste potenciométrico. Trocou-se a bureta

de 25 mL para 10 mL com a intenção de titular a cada 0,25 mL, tornando a titulação mais precisa. Foi realizado uma quadruplicata e o grau de desacetilação ficou em 18,1% (GD), ou seja, não houve desacetilação do material, permanecendo quitina.

Na Figura 4, é demonstrado o comportamento das curvas de inflexão dos testes potenciométricos do último ensaio, em quadruplicata, onde os graus atingidos estão abaixo do esperado. Embora os gráficos A C e D tenham apresentados dois picos suaves, a relação de mols de NaOH para neutralizar os mols de íons NH_3^+ presentes na quitosana (SWEIDAN *et al.*, 2011) não foi equilibrada.

Figura 4 - Pontos de inflexão do teste potenciométrico.



Fonte: Autor

5.2 Desacetilação da quitina no reator e grau de desacetilação

Os testes para confirmar a metodologia foram feitos com quitosana comercial ($GD \cong 75\%$) em triplicata e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6. Os valores do GD obtido nas três titulações estão próximos entre si e se aproximam do valor fornecido pelo fabricante ($GD \cong 75\%$), o que confirmou a metodologia de Tan et al. (1998).

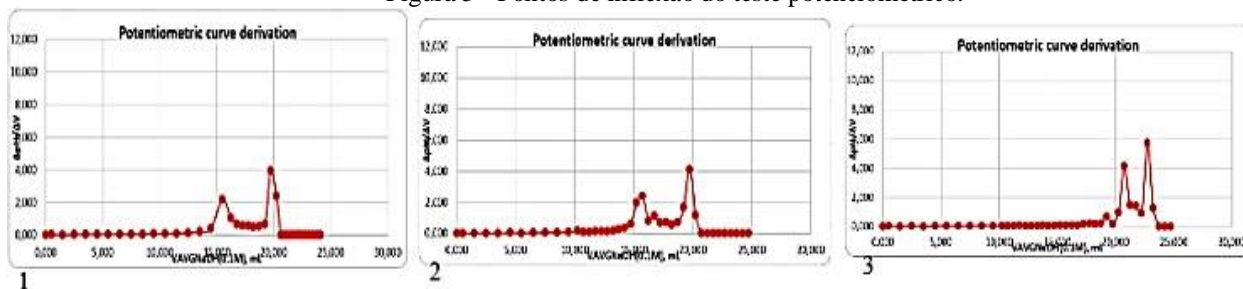
Tabela 6 - Teste potenciométrico da quitosana comercial.

ID amostra	GD (%)
1	73
2	70
3	70

Fonte: Autor

Na Figura 5, é possível entender como precisa ocorrer o comportamento dos pontos de inflexão quando a amostra titula apresenta um alto grau de desacetilação. Os gráficos 1, 2 e 3, que correspondem ao teste da Tabela 6, apresentaram os dois pontos de inflexão necessários, ou seja, houve a determinação final a partir do pH. No início, a variação do pH é pequena, torna-se mais acentuada à medida que a reação se aproxima do ponto estequiométrico.

Figura 5 - Pontos de inflexão do teste potenciométrico.



Fonte: Autor

No processo de desacetilação da quitina utilizando agitador magnético mostrado na Tabela 7, observou-se que foi necessário grande volume de água na etapa de filtragem com mínimo de 12 litros e máximo de 14 litros. Além disso, houve perda considerável de amostra, recuperando 0,7 g de material para 2 g iniciais. O GD permaneceu abaixo do esperado, apresentando máximo de 54% GD. Contudo, neste ensaio foi possível observar que, embora o GD tenha sido abaixo de 75%, houve desacetilação da quitina, obtendo quitosana nos três testes.

Tabela 7 - Processo alcalino de desacetilação da quitina.

ID teste	NaOH (%)	Massa da quitina (g)	Temperatura do reator (°C)	Tempo da reação	Volume de H ₂ O gasto (L)	Massa quitosana recuperada (g)	GD (%)
1							47
2	50	2	110	3	14	0,7	37
3					12		54

Fonte: Autor

Como mostra a Tabela 8, a reação de desacetilação no reator de metal aumentou a massa de quitosana recuperada. Considerando que anteriormente, nos testes utilizando o agitador magnético, para cada 2 g de quitina era recuperado 0,7 g de material. Enquanto neste método, do reator, para cada 4 g de quitina foi possível recuperar 1,6 g de material. Contudo, esse aumento ainda continua parecido com o rendimento no método anterior.

As reações de 2 e 3 horas apresentaram maior eficiência, com destaque para a de 3 horas a 140 °C que apresentou maior GD, enquanto a reação de 1 hora não ocorreu desacetilação,

permanecendo quitina. Além disso, quanto menor o tempo de reação, maior é o volume de água necessário para lavar o material até sua neutralização.

Sendo assim, partindo de uma perspectiva de economia de energia por tempo de reação no reator, embora o teste 2 com 1 hora de reação e o teste 4 com 4 horas de reação tenham apresentado o mesmo GD de 45%, o teste 2 foi selecionado para formar biogel. O mesmo critério foi aplicado para os testes 3 e 5 que apresentaram o mesmo GD de 54%, o qual o teste 3 com 3 horas de reação foi selecionado para formar biogel. O teste 6 com 3 horas de reação, por ter apresentado o maior GD de todos, 62%, também foi selecionado para formar biogel.

Tabela 8 - Processo alcalino de desacetilação da quitina.

ID teste	NaOH (%)	Massa de quitina (g)	Temperatura do reator (°C)	Tempo da reação	Volume de H ₂ O gasto (L)	Massa quitosana recuperada (g)	GD (%)
1				1			37
2			120	2	6,5		46
3				3			54
4	50	4		4	6	1,6	46
5			123	3			54
6			140	3	5		62
7				4			54

Fonte: Autor

5.3 Formação e secagem dos biofilmes

Na Figura 6 encontram-se os biofilmes em placa Petri 12 cm² em ordem crescente de GD.

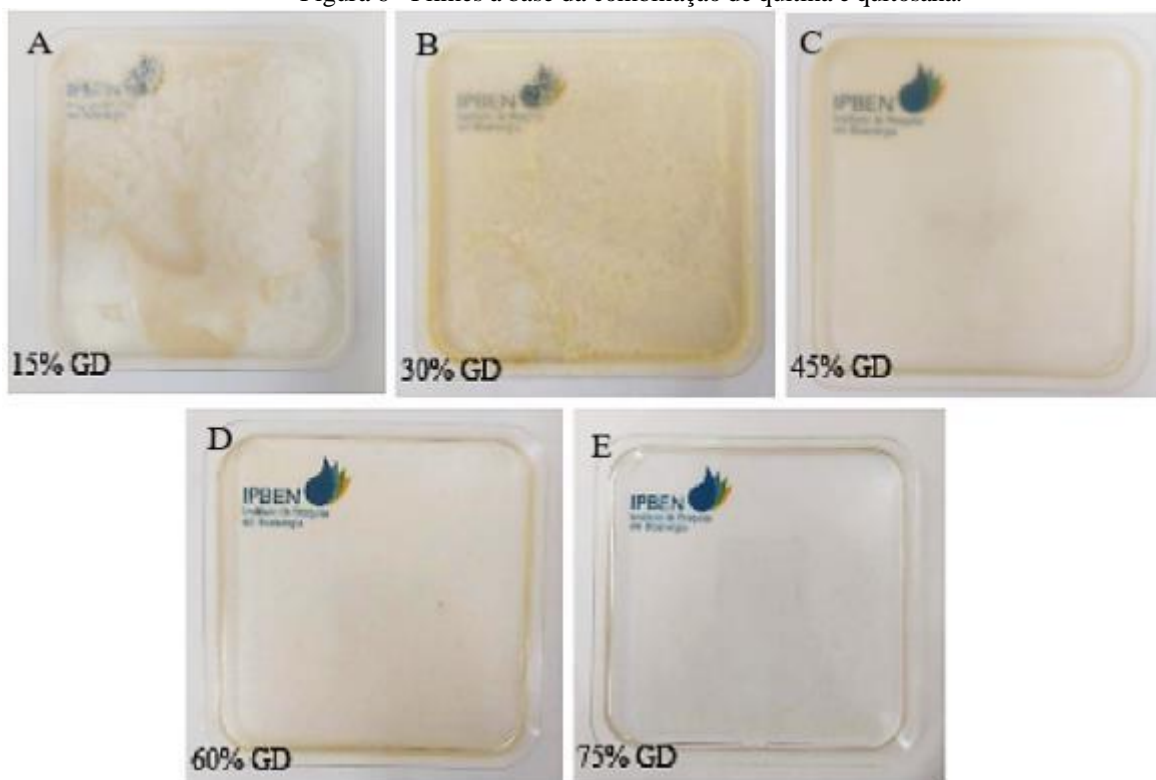
Na Figura 6-A, encontra-se um biofilme composto apenas por quitina, com 15% GD. Este material além de apresentar aderência à placa Petri, por ser quitina, era esperado que não formasse filme, comparado com a quitosana comercial. Na Figura 6-B, encontra-se um filme de 30% GD. Aqui o material possui uma porcentagem de quitosana comercial (sendo composto por 0,75 g de quitina + 0,25 g de quitosana), contudo, assim como o material da Figura 6-A, também apresentou aderência à placa Petri, o que estava de acordo com as expectativas, considerando que ambos consistem em uma maior proporção de quitina comercial de pureza reduzida, tornando o manuseio mais desafiador.

Na Figura 6-C, encontra-se um biofilme composto metade por quitina e metade quitosana (0,5 g de quitina + 0,5 g de quitosana), com 45% GD. A partir desse grau o material é considerado

quitosana, portanto, possível remover da placa Petri. Na Figura 6-D, encontra-se um biofilme que possui mais quitosana (sendo composto por 0,75 g de quitosana + 0,25 g de quitina), com 60% GD. Na Figura 6-E, encontra-se um biofilme que possui apenas quitosana comercial, com 75% GD, portanto, um material mais puro.

Os biofilmes de 45%, 60% e 75%, demonstraram um desempenho superior, o que facilitou o manuseio ideal para os subseqüentes testes de suas propriedades físico-químicas e mecânica. Essas concentrações, especialmente as de 60% e 75%, contêm uma proporção maior de quitosana pura, o que era previamente esperado resultar em um desempenho aprimorado.

Figura 6 - Filmes à base da combinação de quitina e quitosana.



Fonte: Autor

Na Figura 7 encontram-se os biofilmes em placa Petri 12 cm² em ordem crescente de GD.

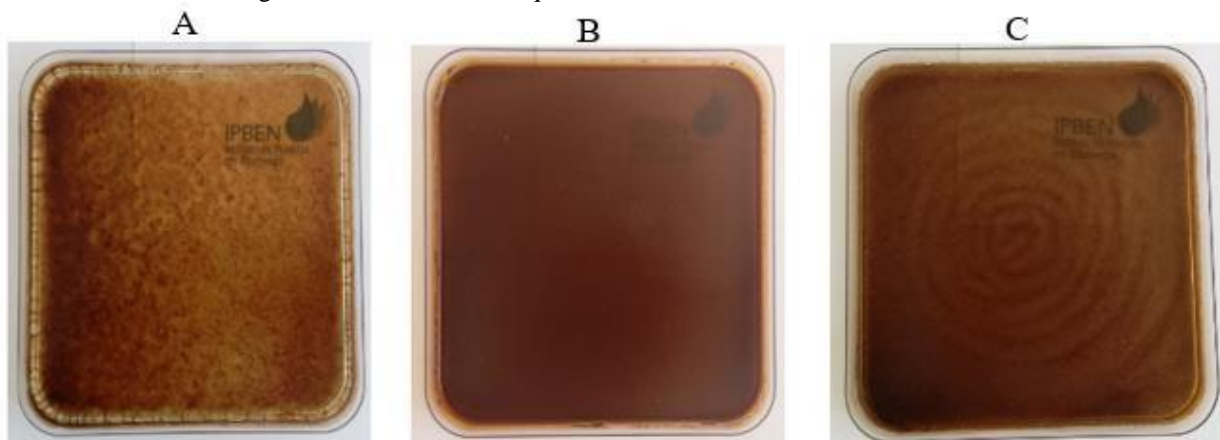
Na Figura 7-A, encontra-se um biofilme de 46% GD, o qual apresentou aderência à placa Petri que não pode ser desfeita, portanto, sendo o único que não passou por testes de caracterização. Este material possui baixa desacetilação, ou seja, baixa pureza do material, o que torna o manuseio mais desafiador. Na Figura 7-B, encontra-se um biofilme de 54% GD e partir daqui foi possível remover da placa Petri, contudo, foi o que demonstrou o manuseio mais difícil, principalmente na

realização dos testes de caracterização, especialmente por romper mais facilmente na etapa do teste de resistência à tração. Devido a essa característica, foi o único que precisou de duplicata, pois parte do material foi perdido durante o processo de remoção de sua aderência à placa Petri.

Na Figura 7-C, encontra-se um biofilme de 62% GD, sendo o que demonstrou desempenho superior, o que facilitou o manuseio ideal para os subseqüentes testes de suas propriedades físico-químicas e mecânica. Embora apresente impureza, principalmente demonstrado pela cor que o material adquiriu, contém porcentagem significativa de quitosana em sua composição suficiente para formar biogel.

Outra característica que foi possível observar foi que a quitosana desacetilada no reator de metal, durante o processo de filtragem para remoção do NaOH, adquiriu coloração escura, em tom vermelho terroso, comparado com a quitosana comercial de alta pureza que apresenta coloração clara levemente bege.

Figura 7 - Filmes à base de quitosana desacetilada com 46%, 54% e 62% de GD.



Fonte: Autor

5.4 Caracterização dos biofilmes

Para os testes de caracterização dos biofilmes, da primeira parte de desacetilação da quitina, dos biofilmes da quitosana combinada com quitina, selecionou-se os biofilmes de 45% GD (composto por 0,5 g de quitina + 0,5 g de quitosana), 60% GD (0,75 g de quitosana + 0,25 g de quitina) e 75% GD (composto por quitosana). Os testes foram realizados em triplicata.

Na Tabela 9, encontram-se os resultados dos testes de espessura e opacidade. Nos testes de espessura era esperado que a uniformidade não fosse alcançada, uma vez que o biofilme não é homogêneo, apresentando variações, ou seja, relevo, na espessura em toda a sua extensão pela

placa Petri. Essa espessura no biofilme de 45% apresentou a maior variação, sendo o mínimo 0,1 nm e máximo de 1,1 nm de espessura. Enquanto a espessura no biofilme de 60% apresentou pouca variação, ficando entre 0,1 nm e 0,2 nm. O biofilme de 75% foi o mais uniforme, apresentando baixa variação de espessura na segunda casa decimal.

Nos testes de opacidade, observou-se que a maior absorbância está relacionada com a maior presença de quitosana na composição do material, o que pode ser verificado conforme o GD aumenta.

Tabela 9 - Testes de espessura e opacidade.

Filmes	Espessura (nm)	Comprimento de onda (nm)	Transmitância (%)	Absorbância
45%	0,1	450	0,27	2,57
	0,12		0,2	2,7
	1,1		0,23	2,64
60%	0,11		0,04	3,4
	0,2		0,02	3,7
	0,18		0,04	3,4
75%	0,06		0,01	4
	0,04		0,02	3,7
	0,07		0,01	4

Fonte: Autor

Na Tabela 10, encontram-se os resultados de solubilidade e umidade. Foi possível observar que a quantidade de quitina comercial na amostra está diretamente relacionada à maior absorção de umidade e à maior massa solubilizada. O biofilme de 45% GD apresentou 0,14 g de massa solubilizada comparado com 0,03 g de massa solubilizada para os biofilmes de 60% e 75% GD.

Nos testes de umidade, observou-se pouca variação, com valores muito próximos entre si. Neste caso, um maior ou menos GD não interfere diretamente na solubilidade do material desde que seja quitosana.

Tabela 10 - Testes de solubilidade e umidade.

Solubilidade			
Filmes	Massa inicial (pós estufa) (g)	Massa final (pós imersão em H₂O e estufa) (g)	Massa solubilizada (g)
45%	0,19	0,05	0,14
60%	0,1	0,07	0,03
75%	0,14	0,11	0,03
Umidade			
Filmes	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Umidade absorvida (g)
45%	0,15	0,18	0,03
60%	0,15	0,17	0,02
75%	0,06	0,08	0,02

Fonte: Autor

Nos testes de resistência mecânica, Tabela 11, foram testadas 7 fitas de cada amostra com 4 cm de comprimento e 1 cm de largura. Nas amostras do biofilme de 45% GD, observou-se uma variação mínima, sugerindo uma uniformidade na espessura das tiras, o que se traduziu em diferenças baixas entre elas. Nas amostras de 60% GD, observou-se uma variação no rompimento das amostras. Isso pode ser atribuído à sua heterogeneidade, uma vez que, durante o processo de secagem, o biofilme não se forma de maneira uniforme na placa Petri, resultando em regiões de diferentes espessuras. Como resultado, as tiras recortadas dos biofilmes, provenientes de áreas aleatórias, exibiram espessuras distintas, o que influenciou a média da força (N) necessária para o rompimento (MPa). Como esperado, as amostras de 75% GD demonstraram maior resistência à ruptura, o que se deve à sua composição consistindo exclusivamente de quitosana pura da Sigma Aldrich.

Tabela 11 - Testes de resistência à tração no DMA.

Filmes	Mpa	Média	Desvio Padrão
45%	3,86	3,8	1,3
	5,32		
	3,17		
	2,66		
	2,4		
	5,4		
60%	12,83	9,7	6
	6,01		
	14,57		
	6,93		
	17,22		
	1,17		
75%	61,47	55,5	3,4
	53,18		
	58,37		
	54,47		
	54,76		
	51,14		

Fonte: Autor

Nos testes da segunda parte da desacetilação, realizada no reator, para os testes de caracterização dos biofilmes, foram selecionados os biofilmes de 54% e 62% GD.

Na Tabela 12, encontram-se os testes de espessura e absorbância. Foi possível observar que, como era esperado, a uniformidade entre as amostras do mesmo material não seria alcançada, uma vez que o filme não é homogêneo, apresentando variações, ou seja, relevo, na espessura por toda a extensão da placa Petri, de 12 cm². Essa variação para o biofilme de 54% GD ficou entre 0,09 nm e 0,13 nm, enquanto o biofilme de 62% GD apresentou variação entre 1,14 nm e 0,2 nm. Nos testes de opacidade, observou-se que o material com maior grau de desacetilação, 62%, apresentou maior capacidade de absorbância.

Tabela 12 - Testes de espessura de opacidade.

Filmes	Espessura (nm)	Comprimento de onda (nm)	Transmitância (%)	Absorbância
54%	0,09	450	0,2	2,6
	0,11		0,3	2,9
	0,13		0,28	3,1
62%	0,18		0,05	3,6
	0,14		0,02	3,7
	0,2		0,02	3,4

Fonte: Autor

Na Tabela 13, encontram-se os testes de solubilidade e umidade. Foi possível observar que a presença de quitina na amostra, ou seja, o material com menor grau de desacetilação – que neste caso é o filme de 54% GD - está diretamente relacionada a maior absorção de umidade e a maior quantidade de massa solubilizada. Essa diferença foi possível observar no fato de que o biofilme de 54% GD teve 0,1 g de massa solubilizada enquanto o de 62% GD diminuiu para 0,04 g de massa solubilizada. Enquanto nos testes de umidade, houve aumento de solubilidade para o biofilme de 62% G, sendo de 0,05 g de massa absorvida para 0,02 g de massa absorvida no biofilme de 54% GD.

Tabela 13 - Testes de solubilidade e umidade.

Solubilidade			
Filmes	Massa inicial (pós)	Massa final (pós imersão em H ₂ O e)	Massa solubilizada (g)
54%	0,2	0,09	0,11
62%	0,1	0,06	0,04
Umidade			
Filmes	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Umidade absorvida (g)
54%	0,15	0,17	0,02
62%	0,17	0,22	0,05

Fonte: Autor

Na Tabela 14, encontram-se os testes de resistência à tração (resistência mecânica) realizadas no DMA (Discovery DMA – 850). Foram testadas 7 fitas de cada amostra, com 4 cm de comprimento e 1 cm de largura cada. Foi possível observar que as amostras dos biofilmes de 54%

GD apresentaram maior desvio padrão entre as amostras, além do dado principal que é a menor resistência de rompimento. Como esperado, as amostras do biofilme de 62% GD apresentaram maior resistência à ruptura, o que pode ser explicado pelo grau de desacetilação mais elevado, o que significa mais grupos de aminoácidos disponíveis, que podem formar mais interações intermoleculares, melhorando a resistência mecânica. Segundo o que relatou Dutta, 2004, a resistência à tração de filmes de quitosana variam na faixa de 30-70 Mpa, dependendo do grau de desacetilação e da espessura do filme. Ao comparar este resultado (DUTTA, 2004) com a média de 14 Mpa do biofilme de 62% GD, pode considerar que caso o grau de desacetilação atingisse 70-75% GD, poderia se aproximar ou igualar ao resultado de 30-40 Mpa.

Tabela 14 - Testes de resistência à tração no DMA.

Filmes	Mpa	Média	Desvio Padrão
54%	4,67	5	0,7
	5,19		
	5,4		
	4,93		
	5,37		
	3,66		
	5,93		
	13,84		
62%	17,59	14,55	0,5
	14,58		
	12,26		
	14,47		
	14,94		
	14,17		

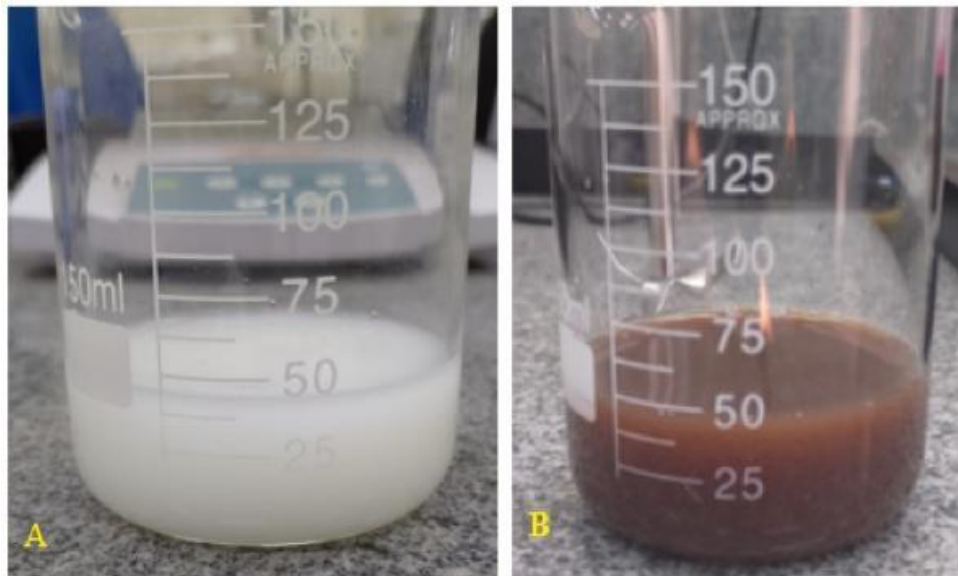
Fonte: Autor

5.5 Emulsão de eugenol com quitosana desacetilada

Na Figura 8, encontra-se uma emulsão com quitosana comercial (GD \cong 75%) como base. Comparado com a emulsão da esquerda (Figura 8-A), a emulsão com a quitosana desacetilada de 62% GD não atingiu estado de gel, permanecendo líquida (Figura 8-B). Para a quitosana comercial (GD \cong 75%) a análise de CRO revelou um valor de 56,68%. Segundo Blake & Marangoni (2015), um alto CRO (até 95%) é uma característica desejável em biogéis, pois está associado à estabilidade física, refletindo a formação de uma rede física mais forte e com maior capacidade de

aprisionamento de óleo. Para a quitosana desacetilada de 62% GD, não foi possível realizar o teste seguinte da caracterização da emulsão para determinar a capacidade de retenção de óleo.

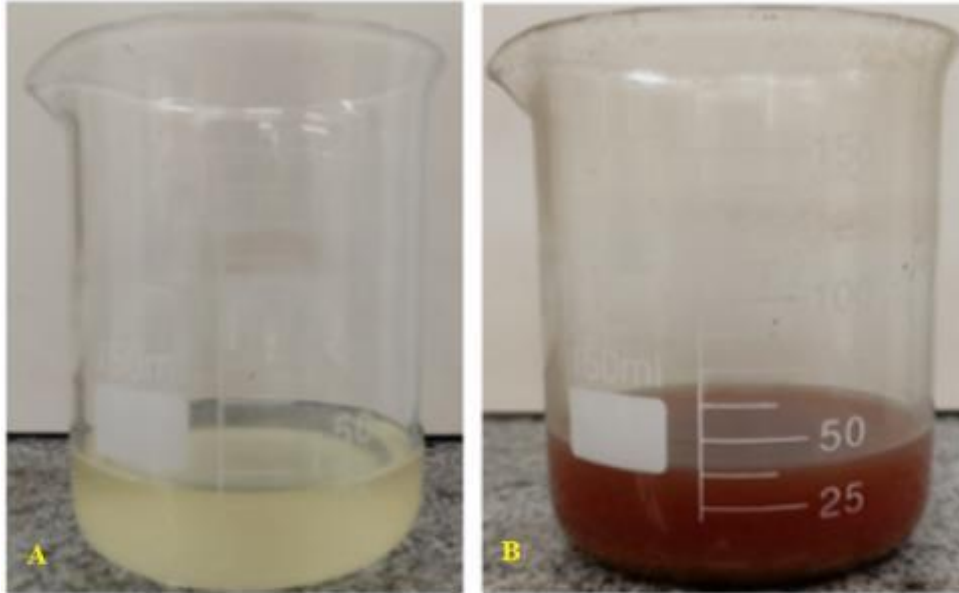
Figura 8 - Emulsão de eugenol com quitosana comercial (A) e quitosana desacetilada (B).



Fonte: Autor

Na Figura 8-B, observou-se que houve sedimentação do material após 7 dias em repouso, o que não ocorreu com a emulsão referência de quitosana comercial (Figura 10-A). Isso demonstra que durante o processo de agitação da emulsão não ocorreu uma mistura eficiente da quitosana desacetilada com o eugenol, o que justifica não ter ocorrido o encapsulamento dessa quitosana, Figura 9.

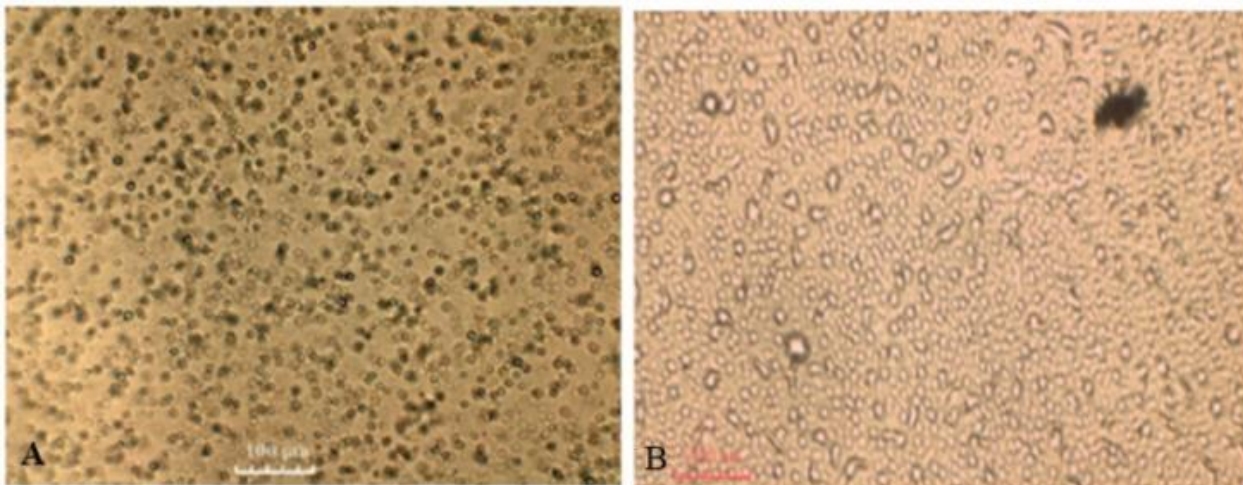
Figura 9 - Emulsão de eugenol com quitosana comercial (A) e desacetilada de 62% (B) após 7 dias em repouso.



Fonte: Autor

A emulsão de eugenol foi analisada no microscópio com uma ampliação de 2000x. Na Figura 10-A, observa-se a quitosana comercial com 75% de pureza, utilizada como uma referência. Nela, é possível identificar pontos brancos que possuem bordas arredondadas e pretas, indicando o encapsulamento da quitosana pelo eugenol. Na Figura 10-B encontra-se uma quitosana com 62% de desacetilação, que mostra a ausência de encapsulamento eficaz e exibindo manchas, indicando que, apesar do grau de desacetilação ter sido o maior obtido dentre os métodos, esse material não atingiu o GD necessário para formar uma emulsão estável com eugenol.

Figura 10 - Emulsão de eugenol quitosana comercial (A) e com quitosana desacetilada de 62% GD (B).



Fonte: Autor

6 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados demonstraram que, na primeira parte dos testes, no contexto do primeiro procedimento de purificação e desacetilação da quitina no agitador magnético, identificou-se que a etapa de secagem na estufa desempenhou um papel relevante no processo. A amostra, por sua impureza determinada pelo baixo GD, provavelmente continha uma quantidade reduzida de grupos amino, cuja protonação ocorreu mais cedo do que o previsto. Além disso, o grau de desacetilação mínimo para formar biofilme era de 45% GD, o que não foi possível obter. No entanto, foi possível obter essa concentração por meio da combinação de quitina comercial com a pura da Sigma Aldrich.

A quantidade de material final recuperado após o processo de filtração foi notavelmente diminuta comparado com grande quantidade de água utilizada no processo de lavagem. Dessa forma, este estudo demonstrou que o biofilme de 60% de pureza, por conter maior quantidade de quitosana pura, apresentou resultados satisfatórios para os testes de caracterização.

Na segunda parte dos testes, o processo de desacetilação no reator de metal demonstrou ser mais eficaz tanto no aumento da quantidade recuperada quanto no aumento do grau de desacetilação. Além disso, usou-se menor volume de água na etapa de filtragem para retirada do NaOH. Contudo, a quantidade de material final recuperado após o processo de filtração foi notavelmente diminuta comparado com a quantidade de água utilizada no processo de lavagem. Devido o processo de desacetilação utilizar quantidade significativa de NaOH (50%), há corrosão da parede interna do reator que pode estar liberando poucas quantidades de metal dissolvido na solução, mas suficiente para interferir na cor do material.

Os resultados apresentados demonstram que, embora a desacetilação tenha alcançado 62% de GD, apresentando resultados satisfatórios para os testes de caracterização das propriedades físico-químicas e mecânicas como opacidade, solubilidade, umidade e resistência à tração, não foi suficiente para obter emulsão com eugenol, comprovado tanto pela solução ter permanecido em estado líquido durante a agitação e sedimentado após 7 dias em repouso, quanto na análise em microscopia. Isso sustenta que o processo no reator não desacetilou o suficiente a quitina, sendo necessário um maior grau.

Devido à alta concentração de hidróxido de sódio (NaOH), que pode causar corrosão na parede interna do reator, seria recomendável aplicar um revestimento no interior do reator como proteção do metal. Essa medida evitaria a ação corrosiva do hidróxido de sódio (NaOH), reduzindo

a chance de ocorrer suposta contaminação dessa corrosão sobre a solução por partículas metálicas ou outros materiais gerados durante o processo. Nesse contexto, o ajuste a ser feito, primeiro, precisaria ser na garantia de que a amostra não está recebendo nenhum tipo de contaminação. Além disso, outro aspecto a ser considerado é a temperatura do reator. Uma vez que o máximo testado foi de 140 °C, poderia haver testes com temperaturas maiores, como 143 °C ou 145 °C para comparar com os resultados que foram obtidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V. Antibacterial plant compounds, extracts, and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MICOL, V. Antibacterial plant compounds, extracts, and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, 2021.

ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, G. G.; HERAS, A. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v.3, p.203-230, 2009.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p.223-228, 2003.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n.3, p.27-34, 2007.

BEHLAU, F.; SCANDELAI, L. H. M.; DA SILVA, G. J. R.; LANZA, F. E. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. **Crop Prot.**, v. 94, p. 185–191, 2017.

BERTUZZI, M. A.; GOTTIFREDI, J. C.; ARMADA, M. Propriedades mecânicas de filme à base de amido de milho de alto teor de amilose gelatinizado em baixa temperatura. **Brazilian Journal of Food and technology**. v. 15, n. 3, p. 219-227, 2012.

BEREZINA, N. Production and application of chitin. **Physical Sciences Reviews**. v. 1, n. 9, 2016.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. (2009). Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal** 46 (2009) 199-204.

BRITO VB, PEIXOTO VDS, MARTINS MT, ROSÁRIO DKA, RACT JN, CONTE-JÚNIOR CA, TORRES AG, CASTELO-BRANCO VN. Development of chitosan-based oleogels via crosslinking with vanillin using an emulsion templated approach: Structural characterization and their application as fat-replacer. **Food Structure**, Volume 32, 2022, 100264, ISSN 2213-3291.

CACCALANO, M. N.; DILARRI, G.; ZAMUNER, C. F. C.; DOMINGUES, D. S.; FERREIRA, H. Hexanoic acid: a new potential substitute for copper-based agrochemicals against citrus canker. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, p. 2488-2499, 2021.

CAGED – Cadastro Geral de Empregados e Desempregados (Ministério do Trabalho).

CAMPOS, M. G. N.; GROSSO, C. R. F.; CÁRDENAS, G.; MEI, L. H. I. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. **Macromolecular Symposia**, v.229, p.253-257, 2005.

CANELLA, K. M. N. de C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v.24, n.1, p.13-17, 2001.

CAVALCA, L. B. Efeito bactericida do galato de hexila sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seu potencial no controle do cancro cítrico. (Dissertação de Mestrado), Programa de PósGraduação em **Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)**, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Rio Claro – SP, 2018.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, p.261-268, 2001.

CHEN, Long et al. Preparation and properties of chitosan/lignin composite films. **Chinese Journal of Polymer Science**, Hackensack, v. 27, n. 05, p. 739–746, 2009.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. 2005. 194p. Tese (Doutorado) – **Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2005.

DE SOUZA, R. H. F. V. Síntese, caracterização e estudo de derivados anfifílicos de quitosana: estudo in vitro contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

DON, T.-M.; KING, C.-F.; CHIU, W.-Y.; PENG, C.-A. Preparation and characterization of chitosan-g-poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl alcohol) blends used for the evaluation of bloodcontacting compatibility. **Carbohydrate Polymers**, v.63, p.331-339, 2006.

DUTTA, P. K., et al. (2004). "Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications." **Food Chemistry**, 114(4), 1173-1182.

FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. (2007). Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(2): 369-375.

FERREIRA, AR; SOARES, NF; SILVA, WA Propriedades físico-químicas de filmes à base de quitosana: influência do pH e plastificantes. **Polímeros**, São Paulo, v. 4, pág. 267–276, 2018

FUNDECITRUS. Fundo De Defesa Da Citricultura.

GALLO, J. A. Q.; DEBEAUFORT, F.; CALLEGARIN, F.; VOILLEY, A. Lipidic hydrophobic, physical state and distribution effects on the properties of emulsion-based films. **J. Membr. Sci.**, v. 180, n. 1, p. 37- 46, 2000.

GRAHAM, J. H.; JOHNSON, E. G.; MYERS, M. E.; YOUNG, M.; RAJASEKARAN, P.; DAS, S.; SANTRA, S. Potential of nano-formulated zinc oxide for control of citrus canker on grapefruit trees. **Plant Disease**, v. 100, p. 2442–2447, 2016.

GONÇALVES, M. de L. S. S. Métodos instrumentais para análise de soluções. Lisboa: **Fundação Calouste Gulberkian**, 2001. 1050p.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 868p.

IMRE, B.; PUKÁSZNKY, B. Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. **European Polymer Journal**. v. 49, p. 1215-1233, 2013.

IMRE, B.; GARCÍA, L.; PUGLIA, D.; VILAPLANA, F. Reactive compatibilization of plant polysaccharides and biobased polymers: Review of current strategies, expectations and reality. **Carbohydrate Polymers**, v. 209, p. 20–37. 2019.

JOSHI, T.; JOSHI, T.; SHARMA, P.; CHANDRA, S.; PANDE, V. Molecular docking and molecular dynamics simulation approach to screen natural compounds for inhibition of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* by targeting peptide deformylase. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, p. 823-840, 2021.

KASAAI, M. R. Various methods for determination of the degree of n-acetylations of chitin and chitosan: a review. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v.57, p.1667-1676, 2009.

KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H. DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v.104, p.6017-6080, 2004.

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYNSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v.8, p.1567-1636, 2010.

KRITCHENKOV, AS, et al. (2023). Filmes antibacterianos à base de quitosana para aplicações biomédicas e alimentares. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10738.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v.32, n.3, p.672-678, 2009.

LAVORGNA, Marino et al. Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. **Carbohydrate Polymers, Amsterdam**, v. 82, n. 2, p. 291–298, 2010.

- LLANOS, JR, TADINI, CC, GASTALDI, E. New strategies to fabricate starch/chitosan-based composites by extrusion, *J. Food Eng.* 290 (2021) 110224.
- LUCENA, C. A. A. (2011). Produção de filmes biodegradáveis à base de xilana de sabugo e milho. Universidade Estadual da Paraíba. João Pessoa – PB.
- MA, G.; YANG, D.; SU, D.; UM, X.; KENNEDY, J. F.; NIE, J. Preparation and properties of water-soluble chitosan and polyvinyl alcohol blend films as potential bone tissue engineering matrix. *Polymers Advanced Technology*, v.21, p.189-195, 2009.
- MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. (2010). Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina: Ciências Agrárias*, vol. 31, núm. 1, 2010, pp. 137-155. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Brasil.
- MATTEI, D.; GUIMARÃES, L. F.; FERREIRA, F. B. P.; SANTOS, S. R. S. R. dos; MARTIN, A. A.; GAZIM, Z. C.; DRAGUNSKI, D. C. (2013). Análises das propriedades físicas e antimicrobianas de filmes a base de amido contendo óleo essencial de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd e *Rosmarinus officinalis* L. - LAMIACEAE. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 16, n. 2, p. 129-136.
- MEDEIROS, G. A. (2011). Sandálias de borracha: uma proposta de trabalho temática para o conteúdo de polímeros. Universidade de Brasília, **Instituto de Química**. Brasília – DF.
- MENG, Zong & Qi, Keyu & Guo, Ying & Wang, Yong & Liu, Yuanfa. (2017). Macro-microstructure characterization and molecular properties of emulsion-templated polysaccharide oleogels. *Food Hydrocolloids*. 77. 10.1016/j.foodhyd.2017.09.006.
- MORÃO, L. G. Chalconas e curcuminoides como novas alternativas para combater o cancro cístico e alguns patógenos de interesse clínico. (Doutorado), Programa de PósGraduação em **Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)**, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Rio Claro – SP, 2018.
- MORÃO, L. G.; POLAQUINI, C. R.; KOPACZ, M.; TORREZAN, G. S.; AYUSSO, G. M.; DILARRI, G.; CAVALCA, L. B.; ZIELINSKA, A.; SCHEFFERS, D.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H. A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. *MicrobiologyOpen*, v. 8, p. e00683, 2019.
- MOURA, SENHOR; AZEREDO, HM; MATTOSO, LH Nanoestruturas em biopolímeros para embalagens ativas. *Química Nova*, São Paulo, v. 5, pág. 685-692, 2020.
- NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MARQUES, V. N.; MARTINEZ, L. F. Global orange juice market: a 16-year summary and opportunities for creating value. *Tropical Plant Pathology*, v. 45, p.166–174, 2020.
- NG, W.; SHIT, C.; EE, K.; CHAI, T. Plant Natural Products for Mitigation of Antibiotic Resistance. *Sustainable Agriculture Reviews*, 2021.

OLIVEIRA, F. M. Determinação do grau de desacetilação da quitosana por meio das técnicas de titulação potenciométrica e espectrofotometria de ultravioleta visível. Trabalho de Conclusão de Curso, 2012. **Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais**.

PALMU, P. S. T. Preparação, propriedades e aplicação de biofilmes comestíveis à base de glúten de trigo. Campinas, 2003, 244 p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), **Faculdade de Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP).

PARKER, L. (2018). The great Pacific garbage patch is not what you think it is. **National Geographic**.

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v.34, p.641-678, 2009.

POLAQUINI, C. R.; MORÃO, L. G.; NAZARÉ, A. C.; TORREZAN, G. S.; DILARRI, G.; CAVALCA, L. B.; et al. Antibacterial activity of 3,3'-dihydroxycurcumin (DHC) is associated with membrane perturbation. **Bioorganic Chemistry**, v. 90, p. 103031, 2019.

PUERTA, M.; MONTENEGRO, H.; MONTENEGRO, D. V. Evaluación del quitosano a partir del grado de desacetilación de la quitina. **Scientia**, Vol. 25, N° 1, 103-114, 2015.

Raut, J.S. and Karuppayil, S.M. (2014) A Status Review on the Medicinal Properties of Essential Oils. **Industrial Crops and Products**, 62, 250-264.

RAY, S.; KUNDU, P. Modificação de filmes de quitosana: Estratégias e aplicações. *Journal of Biopolymers*, v. 102, n. 3, p. 123–130, 2015.

RINAUDO, M. Chitin and Chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, p.603-632, 2006.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Materiais biodegradáveis para aplicações em embalagens de alimentos. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 450–472, 2011.

SANTOS, J. E dos. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. 2004. 112f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

SCHMIDT, V. C.R.; PORTO, L. M.; LAURINDO, J. B.; MENEGALLI, F. C. (2012). Water vapor barrier and mechanical properties of starch films containing stearic acid. **Industrial Crops and Products**, v.41, n. 2013, p. 227– 234.

SENTELHAS, P. C. Agrometeorologia dos citros. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JÚNIOR, P. (Ed.). Citros. Campinas: **Instituto Agrônomo**, Fundag, p. 319-341, 2005.

SHAH, S. et al. Nanoemulsões de quitosana-eugenol como sistemas de entrega bioativos. **Journal of Colloid Science**, 2020.

SILVA, R. M.; SILVA, G. A.; COUTINHO, O. P.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Preparation and characterization in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.15, p. 1105-1112, 2004.

SILVA; R. M. P. da; MANO, J. F.; REIS, R. L. Straightforward determination of the degree of n-acetylation of chitosan by means of first-derivative UV spectrophotometry. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v.209, p.1463-1472, 2008

SOUSA, F. et al. Aplicação de eugenol em emulsões: Desafios e oportunidades. **Pharmaceutical Science Reviews**, v. 12, p. 45-58, 2019.

SILVA E. M. (2011). Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **Departamento de Engenharia Química**. Porto Alegre.

SWEIDAN, K.; JABER, A.; AL-JABOUR, N.; OBAIDAT, R.; AL-REMAWI, M.; BADWAN, A. Further investigation on the degree of deacetylation of chitosan determined by potenciométrica titration. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v.2, n.1, p.16-25, 2011.

TUZLAKOGLU, K.; ALVES, C. M.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffold for tissue engineering applications. **Macromolecular Bioscience**, v.4, p.811-819, 2004.

VELDE, K. V. de; KIEKENS, P. Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutylchitin by FTIR spectroscopy and solid state ¹³C NMR. **Carbohydrate Polymers**, v.58, p.409-416, 2004.

WESKA, R F et al. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 749–753 ,2007.

WU, T.; ZIVANOVIC, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.248- 253, 2008.